

MEASURING METHOD FOR ANTIGEN

Patent Number: JP6109734
Publication date: 1994-04-22
Inventor(s): TAKEMURA KEIKO; others: 03
Applicant(s):: S R L:KK
Requested Patent: ☐ JP6109734
Application JP19920283500 19920930
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N33/543 ; G01N33/53 ; G01N33/535
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To provide the enzyme immunity measuring method of an antigen having the sensitivity capable of directly monitoring the level of the antigen existing in a Homo sapiens specimen at a trace quantity by combining the sensitization reaction based on the biotinilthyramide reaction and the activity measuring method using alkaline phosphatase.

CONSTITUTION:An antibody for an antigen to be measured is formed into the solid phase, the solid phase is blocked, then a specimen containing the antigen to be measured is reacted. The peroxidase-labeled second antibody for the antigen to be measured is reacted, then biotinilthyramide is reacted under the existence of hydrogen peroxide, alkaline phosphatase-labeled avidin is reacted, and the activity of alkaline phosphatase is measured. The material or shape of the solid phase is not limited in particular as far as the antibody can be fixed, however a micro plate having multiple wells is preferably used in consideration of the fact that many specimens can be concurrently measured. Magnetic particles can be preferably used as the solid phase because of a large surface area and a large reaction speed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-109734

(43) 公開日 平成6年(1994)4月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	C	9217-2 J		
33/53	U	8310-2 J		
33/535		8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数5(全9頁)

(21) 出願番号 特願平4-283500

(22) 出願日 平成4年(1992)9月30日

(71) 出願人 390037006

株式会社エスアールエル

東京都新宿区西新宿2丁目4番1号

(72) 発明者 竹村 恵子

東京都八王子市小宮町51 エスアールエル

八王子ラボラトリー内

(72) 発明者 松崎 正晴

東京都八王子市小宮町51 エスアールエル

八王子ラボラトリー内

(72) 発明者 日比 望

東京都八王子市小宮町51 エスアールエル

八王子ラボラトリー内

(74) 代理人 弁理士 吉井 一男

最終頁に続く

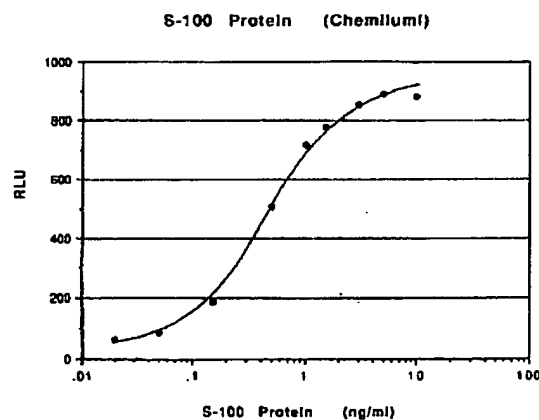
(54) 【発明の名称】 抗原の測定方法

(57) 【要約】

【構成】 測定すべき抗原に対する抗体を固相化し該固相のブロッキングを行った後、測定すべき抗原を含む被検試料を反応させ、測定すべき抗原に対するペルオキシダーゼ標識第2抗体を反応させた後、過酸化水素の存在下にビオチニルチラミドを反応させ、更にアルカリフォスファターゼ標識アビジンを反応させて、該アルカリフォスファターゼの活性を測定する

【効果】 ビオチニルチラミド反応に基づく増感反応とアルカリフォスファターゼを用いる活性測定法とを組合せることにより、EIAによる抗原の高感度測定が可能となる。

発光法標準曲線



キングして用いる。本発明において用いるブロッキング剤としては、公知のものを特に制限なく用いることができる。より具体的には、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、スキムミルク等が好ましく用いられる。また市販のブロッキング剤(例えば商品名:ブロッケー、雪印乳業製)を用いてもよい。

【0012】(抗原)本発明において測定可能な抗原は特に制限されないが、本発明は、特に従来、酵素免疫測定法(EIA)ではヒト血中および髄液中レベルでの測定が困難であったような抗原(調節因子、ホルモン、神経伝達物質等)、より具体的には、例えばS-100等の神経組織関連蛋白質等の測定に好ましく適用できる。

【0013】(被検試料)測定すべき抗原を含有すると考えられる血清、血漿、髄液、培養上清等が用いられる。必要に応じて、被検試料は、緩衝液等で希釈(例えば5~100倍程度に希釈)して用いてもよい。

【0014】(固相化抗体)固相化すべき抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも使用可能である。

【0015】(第2抗体)固相化した抗体とともに、抗原をはさむ(サンドイッチ)べき第2抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも使用可能である。この第2抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)等のペルオキシダーゼで標識する方法としては、公知の方法が特に制限なく用いられる。

【0016】(ビオチニルチラミド反応)本発明におい*

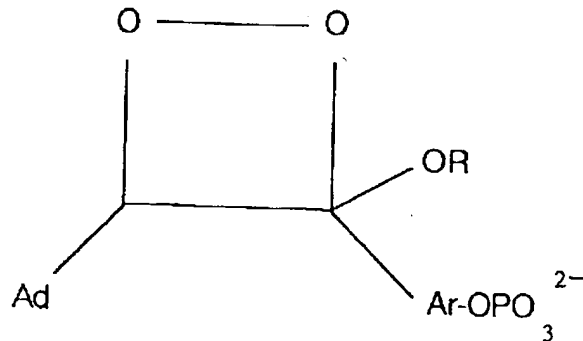
*て、ビオチニル・チラミド(Biotinyl tyramide)は、過酸化水素(H_2O_2)とペルオキシダーゼの存在下にラジカルとなり、ペルオキシダーゼ近傍のブロッキング剤(蛋白質)に選択的に結合するため、後述するアビジン-ビオチン反応との組合せによる増感が可能となる。このビオチニルチラミド反応の詳細については文献(J. Immunol. Methods 125, 279-285 (1989))を参照することができる。

【0017】(アビジン-ビオチン反応)本発明においては、アルカリフォスファターゼ標識アビジン(ストレプトアビジンを包含する趣旨で用いる)を上記ビオチニルチラミド反応の生成物と更に反応させている。このアルカリフォスファターゼ標識アビジンは、上記ビオチンと選択的に結合するため、結果的に第2抗体に結合したペルオキシダーゼの近傍に所定量のアルカリフォスファターゼが存在することとなり、増感が可能となる。

【0018】(基質)本発明において利用可能な基質は、アルカリフォスファターゼ活性の定量が可能である限り、特に制限されないが、感度を向上させる点からは、発光反応を利用することが好ましい。発光反応を利用して酵素活性を測定する場合、基質としては、ジオキセタン誘導体を用いることが好ましい。上記ジオキセタン誘導体としては、下記一般式(化1)に示すものが好ましく用いられる。

【0019】

【化1】



【0020】(式中、Adはスピロ結合を通してジオキセタンへ結合しているアダマンチリデン基を示し、Rは低級アルキル基を示し、Arは芳香族基を示す)。

【0021】前記式(化1)に示すようなジオキセタン誘導体は、例えばヨーロッパ特許公開公報254051号、PCT公開公報WO 8800695号、ないしTetrahedron Lett., 28, 1155-1158 (1987)に記載の方法と同様にして製造することができる。

【0022】前記一般式(化1)中のRとしては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等の低級アルキル基を、Arとしては、フェニレン基、ナフチル基、アントラニル基等の芳香族基を例示することができる。

【0023】尚、前記一般式(化1)で表されるジオキ

セタン誘導体の陽イオンとしてはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、アンモニウム、 $N(R^2)_4^+$ (式中、 R^2 は、メチル、エチル等のアルキル基、ベンジル等のアルキル基を表わす。)で表される四級アンモニウムを例示することができる。

【0024】(増感剤)本発明においては、増感剤として、アルカリフォスファターゼと基質との反応に基づく発光を増進する物質が広く使用可能であるが、特に、ポリアルキル4級アミン、および/又はケイ光剤が好ましく用いられる。

【0025】ポリアルキル4級アミンとしては、例えば、ポリジアリールジメチルアンモニウムクロライド、ポリ[ビニルベンジル(ベンジルジメチルアンモニウ

1反応)。

【0040】洗浄緩衝液で3回固相を洗浄した後、第2抗体たる自家調製の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識S-100抗体をバッファー(2)で20,000倍に希釈して100 μ L/ウエルずつ加え、室温で1時間反応させた。次いで、洗浄緩衝液で3回固相を洗浄した後、ビオチニルチラミド (デュボン社、ELASTキット) をH₂O₂含有緩衝液 (ELASTキット付属) で100倍に希釈して100 μ L/ウエルずつ加え、室温で15分反応させてビオチニルチラミド反応を行った。

【0041】洗浄緩衝液で3回固相を洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (TAGO社製) を緩衝液 (0.5% BSA, 0.05% Tween 20含有0.5M Tris-HCl (pH 8.0) で15,000倍に希釈して100 μ L/ウエルずつ加え、室温で30分反応させてアビジン-ビオチン反応を行った。

【0042】洗浄緩衝液で3回固相を洗浄した後、0.4mMのAMPPD溶液 (1mM MgCl₂含有の100mM ジエタノールアミン溶液 (pH 10.0) 中) を100 μ L/ウエルずつ加えて遮光下室温で20分反応させた。このAMPPD溶液には、10倍に希釈した増感剤 (BDMQ+フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC): 商品名Emerald、トロピックス社製) を共存させた。

【0043】上記反応に基づく発光強度は、マイクロプレートルミノメーター (ダイナテック社製) を用いて測定した。測定結果を図1に示す。上述したようにスタンダードとして牛腦由来S-100を用いた本実施例の測定系の検出範囲は0.02~5 ng/mLであり、検出限界は0.02 ng/mLであった。

【0044】上述した本実施例の測定系により各種疾患の髄液中のS-100を測定したところ、図2に示すデータが得られた。

【0045】比較例1

(比色法) 固相たる96穴マイクロタイタープレート (比色用) にPBSで希釈した抗S-100抗体 (5 μ g/mL) を100 μ L/ウエルずつ分注し、4℃で1晩 (15~18時間) 放置して抗S-100抗体を固相とした。洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20含有PBS) で3回固相を洗浄した後、蒸留水で4倍に希釈したブロッキング剤 (ブロックエース、雪印乳業製) を200 μ L/ウエルずつ分注し、室温で2時間放置して固相のブロッキングを行った。洗浄緩衝液で4回固相を洗浄した。

【0046】次に、抗原として検量線作成のためのスタンダード (標準サンプル) たるS-100 B (シグマ社製) を (反応用アッセイ) バッファー(1)で希釈して0.0, 0.05, 0.15, 0.5, 1, 1.5, 3, 50

5, 10, 15, 30, 50および100 ng/mLの濃度となるようにした (図3参照)。一方、サンプル (被検試料) は、バッファー(2) (0.5% BSA, 0.05% Tween 20含有PBS) で2倍に希釈して用いた。

【0047】上記したスタンダード (又はサンプル) を、上記固相の1ウエルあたり100 μ Lずつ3ウエルに分注 (3重測定) し、室温で2時間反応させた (第1反応)。

【0048】洗浄緩衝液で3回洗浄した後、第2抗体たる自家調製の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識S-100抗体を希釈用緩衝液で20,000倍に希釈して100 μ L/ウエルずつ加え、室温で1時間反応させた。

【0049】次いで、洗浄緩衝液で3回固相を洗浄した後、オルトフェニレンジアミン (OPD、シグマ社) の基質溶液を (3mg/mL) を100 μ L/ウエルずつ加え、室温で遮光下20分間反応させて、上記OPDを発色させた。この発色反応を2N-H₂SO₄を100 μ L/ウエルずつ加えて停止させた後、吸光度 (OD) をイムノリーダー (ダイナテック社製) を用いて波長490 nmで測定した。得られたデータを図3に示す。この図3から明らかなように、比色法を用いた場合のS-100の検出限界は0.2 ng/mLであった。

【0050】実施例2

(希釈試験) 反応用のアッセイバッファー (バッファー(1)) で実施例1で用いたS-100抗原を希釈して異なる3濃度 (1.0, 1.3および2.3 ng/mL) を調製し、更にこれらの溶液を反応用のアッセイバッファーで1/2倍、1/4倍、1/8倍、1/16倍の濃度となるように倍々希釈を重ね、これをサンプルとした以外は、実施例1と同様に測定を行い、実施例1で得られた検量線からS-100濃度 (ng/mL) を求めた。結果を図4に示す。

【0051】図4から明らかなように本実施例の希釈試験においては、それぞれ原点付近を通る直線が得られた。

【0052】実施例3

(添加回収試験) 反応用のアッセイバッファー (バッファー(1)) でS-100 B抗原 (標準品、シグマ社製) を希釈して異なる4濃度 (0.1, 0.2, 0.5および1.0 ng/mL) のサンプル (サンプルA) を調製した。次いで、このサンプルAの調製と同様に異なる4濃度のサンプル (サンプルB) を調製した。濃度測定用のサンプルとして、上記したサンプルA 4種類およびサンプルB 4種類の組合せで合計16種類の等量混和液を調製した。

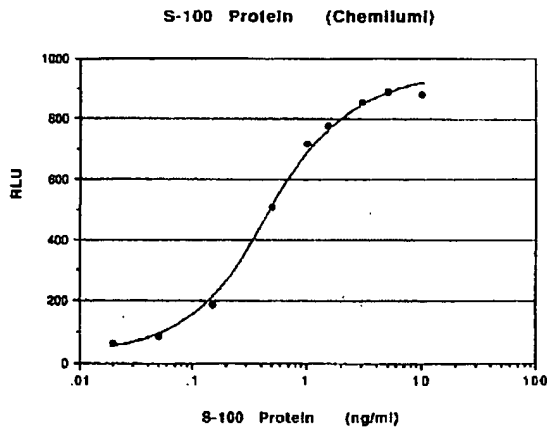
【0053】上記した濃度測定用の16サンプルを用いた以外は、実施例1と同様に測定を行い、実施例1で得られた検量線からS-100濃度 (ng/mL) を求め

示すグラフである。

【図6】磁性粒子を用いた場合の本発明の測定法におけ

【図1】

発光法標準曲線

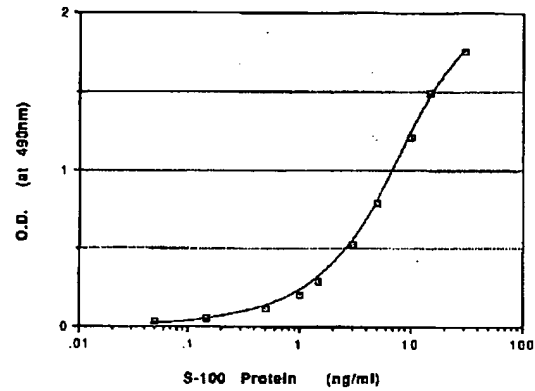


る検量線および比色法における検量線を示すグラフである。

【図3】

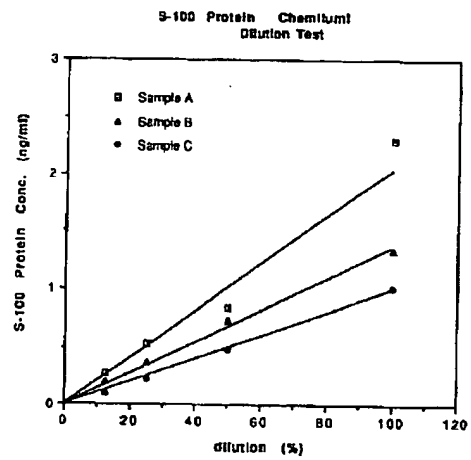
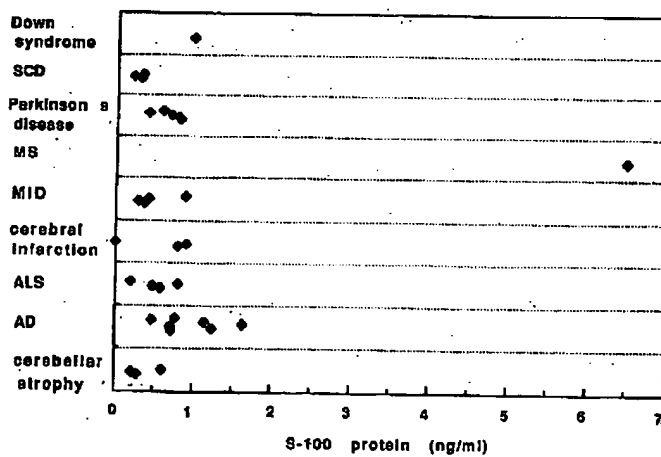
比色法標準曲線

S-100 Protein (Colorimetry)



【図4】

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 久保田 隆廣

東京都八王子市小宮町51 エスアールエル
八王子ラボラトリー内

THIS PAGE BLANK (USPTO)